

阔鳞鳞毛蕨孢子的无菌繁殖

王晓倩, 张婷婷, 孟卓, 董丽*

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京100083

摘要: 以阔鳞鳞毛蕨(*Dryopteris championii*)成熟孢子为外植体, 研究了不同植物生长调节剂及浓度对其孢子萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分化及生根的影响。结果表明: 1/2MS+2%蔗糖为孢子萌发最适培养基, 20 d后萌发率达65%; 诱导愈伤组织的最适培养基为MS+KT 0.5 mg·L⁻¹+2,4-D 1 mg·L⁻¹, 诱导率达39.8%, 愈伤组织为绿色颗粒状; 颗粒状愈伤组织在MS+KT 0.2 mg·L⁻¹的培养基中生长出大量丛生芽, 转化率可达66.3%; MS+IAA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹培养基可有效促进幼孢子体苗生根。

关键词: 阔鳞鳞毛蕨; 愈伤组织; 孢子

In vitro Culture of *Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr. from Spores

WANG Xiao-Qian, ZHANG Ting-Ting, MENG Zhuo, DONG Li*

National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Mature spores of *Dryopteris championii* were used as the explants to study the effects of different kinds and concentrations of plant growth regulators on spore germination, callus induction, bud differentiation and rooting. The results showed that the most suitable medium for spore germination was 1/2MS medium containing 20 g·L⁻¹ sucrose, and after 20 days of culture on this medium, the germination rate of spore was almost 65%. The maximum callus induction rate was 39.8%, which was obtained from the medium of MS supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ KT and 1 mg·L⁻¹ 2,4-D. The best form of callus was green granular; the induced rate of bud from medium of MS supplemented with 0.2 mg·L⁻¹ KT was 66.3%. In addition, MS medium containing 0.2 mg·L⁻¹ IAA and 0.2 mg·L⁻¹ NAA can effectively promote rooting rate.

Key words: *Dryopteris championii*; spore; callus induction

蕨类植物叶形青翠飘逸, 株型婀娜多姿, 观赏价值极高, 在世界观赏植物中占据着重要的位置。我国是世界蕨类植物资源丰富的地区之一, 但我国丰富的蕨类植物资源并没有得到充分的利用, 国内很多具有优良观赏价值的蕨类尚未得到开发, 目前仍从国外引进大量观赏蕨类植物。因此, 对我国本土蕨类植物繁殖方法的研究具有十分重要的意义, 可以为本土蕨类植物的应用推广奠定基础。

阔鳞鳞毛蕨[*Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr.]是鳞毛蕨科(*Dryopteridaceae*)鳞毛蕨属(*Dryopteris*)植物, 叶色鲜绿, 有光泽, 耳状小羽片, 分布广泛。由于其观赏价值较高, 又耐旱、耐阴, 适应性强, 可做林下片植或与山石配植。目前已有对其盆栽引种实验的研究(杨军等2011), 但其组培繁殖技术尚未见报道。本文以其成熟孢子为外植体筛选了适合孢子萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分

化和生根诱导各阶段的最佳培养基, 探索了其组织培养过程中的关键技术, 并建立了阔鳞鳞毛蕨组培快繁体系, 为本种植物的规模化生产及在园林中的推广应用奠定基础。

材料与方法

1 材料

阔鳞鳞毛蕨[*Dryopteris championii* (Benth.) C. Chr.]孢子于2012年采集于南京紫金山, 收集于硫酸纸袋内并放置于4℃冰箱保存, 备用。

2 方法

2.1 孢子的预处理与消毒

将适量孢子置于1.5 mL离心管中, 加入浓度分别为0、50、100 mg·L⁻¹的赤霉素溶液, 浸泡

收稿 2013-11-07 修定 2013-12-13

* 通讯作者(E-mail: dongli@bjfu.edu.cn; Tel: 13911560585)。

5 min, 离心力 $1\ 479\times g$ 离心5 min, 去上清液。随后加入3% NaClO溶液进行消毒, 离心力 $1\ 479\times g$ 离心5 min, 去上清液, 用无菌水冲洗4~5次, 转入10 mL离心管中, 加无菌水稀释, 摇匀后用血球计数板计数, 控制溶液中的孢子密度约为 3×10^3 个 $\cdot mL^{-1}$ 。

2.2 孢子的萌发培养

以MS固体培养基为基本培养基, 设置MS、1/2MS、1/4MS三种无机盐含量, 10、20、30 $g\cdot L^{-1}$ 三种蔗糖浓度, 以及0、50、100 $mg\cdot L^{-1}$ 的三种赤霉素预处理液浓度。采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 共9种培养基, pH均调至6.1, 并加入7 $g\cdot L^{-1}$ 琼脂。灭菌后分装入培养皿中。每皿接入1 mL孢子悬浊液。每种处理重复3次。培养室温度(23 ± 2) $^{\circ}C$, 光强 $15\sim 20\ \mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$, 光照周期12 $h\cdot d^{-1}$ 。播种20 d后在显微镜下统计孢子萌发率。

2.3 原叶体愈伤诱导

设置0.1、0.5、1.0、1.5 $mg\cdot L^{-1}$ 四种KT浓度和0.1、0.5、1.0、1.5 $mg\cdot L^{-1}$ 四种2,4-D浓度, 采用双因子交叉分组设计实验, 共16个处理, pH均调至6.1。各培养基中均添加30 $g\cdot L^{-1}$ 蔗糖和7 $g\cdot L^{-1}$ 琼脂。取原叶体接种到以上16种培养皿中, 每皿接10~15个, 每个处理重复3次, 每30 d继代一次。60 d后观察记录愈伤组织的诱导情况。

2.4 丛生芽诱导及增殖

将诱导出的愈伤组织切割成大小一致(3 mm \times 3 mm)的团块, 接种到以下6种培养基中: (1) MS; (2) MS+NAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$; (3) MS+NAA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$; (4) MS+NAA 1.0 $mg\cdot L^{-1}$; (5) MS+KT 0.2 $mg\cdot L^{-1}$; (6) MS+KT 0.5 $mg\cdot L^{-1}$; 各培养基中均添加30 $g\cdot L^{-1}$ 蔗糖和7 $g\cdot L^{-1}$ 琼脂。每瓶接种4~6块, 重复3次。40 d后统计丛生芽生长情况。

2.5 生根培养

将2.4中诱导出的丛生芽接种到以下5种培养基中(1) MS; (2) 1/2MS; (3) MS+IAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$; (4) MS+NAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$; (5) MS+IAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$ +NAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$ 。各培养基中均添加30 $g\cdot L^{-1}$ 蔗糖和7 $g\cdot L^{-1}$ 琼脂。30 d后观察并统计生根情况。

2.6 炼苗移栽

当孢子体苗根长到2~3 cm, 株高约3 cm时, 把封口膜打开, 在培养室内炼苗3 d。取出生根苗, 洗去培养基, 移栽到经过高温灭菌的草炭、蛭石(1:1)

的混合基质中。栽培环境温度(22 ± 1) $^{\circ}C$, 光照强度 $15\sim 20\ \mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$, 光照周期12 $h\cdot d^{-1}$ 。30 d后统计成活率。

实验结果

1 阔鳞鳞毛蕨的孢子的萌发

实验结果如表1所示, 分析表明, 孢子在1/2MS+20 $g\cdot L^{-1}$ 蔗糖的培养基中萌发率最高。经过100 $mg\cdot L^{-1}$ 的赤霉素溶液浸泡的孢子萌发率更高。经过后期验证, 三种因素的最佳组合为, 经过100 $mg\cdot L^{-1}$ 的赤霉素溶液预处理的孢子, 在1/2MS+20 $g\cdot L^{-1}$ 蔗糖的培养基中培养, 萌发率可以达到65%以上(图1-A)。高浓度的无机盐和蔗糖不利于孢子的萌发。

2 阔鳞鳞毛蕨愈伤组织的诱导

表2可以看出, MS+2,4-D 1.0 $mg\cdot L^{-1}$ +KT 0.5 $mg\cdot L^{-1}$ 对愈伤组织的诱导效果最好, 该培养基所诱导的愈伤组织呈绿色颗粒状, 质地疏松(图1-B), 后期能继续分化出丛生芽, 诱导率可达39.8%。随着生长调节剂浓度的升高, 愈伤组织诱导率下降, 并且出现后期生长不良及褐化的现象。把愈伤组织及时分散成小团颗粒, 放入低浓度的KT和2,4-D培养基中, 可促进愈伤组织增殖。

3 丛生芽的诱导

通过表3的数据可以看出, 愈伤组织在不添加生长调节剂的培养基中就可以分化出丛生芽, 诱导率可以达到65%, 诱导率与添加0.2 $mg\cdot L^{-1}$ KT的诱导率无显著差别。随着KT添加浓度的升高, 诱

表1 不同浓度赤霉素溶液预处理、无机盐和蔗糖下阔鳞鳞毛蕨孢子的萌发率

Table 1 The spores germination rate of *D. championii* in different GA₃, inorganic salt and sucrose concentrations

编号	GA ₃ 浓度/ $mg\cdot L^{-1}$	蔗糖浓度/ $g\cdot L^{-1}$	无机盐	萌发率/%
1	0	10	1/4MS	40.9
2	0	20	1/2MS	54.2
3	0	30	MS	38.6
4	50	10	1/2MS	53.7
5	50	20	MS	49.3
6	50	30	1/4MS	42.4
7	100	10	MS	53.1
8	100	20	1/4MS	62.8
9	100	30	1/2MS	64.5

表2 不同浓度2,4-D和KT对愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of different concentrations of 2,4-D and KT on callus induction

KT浓度/mg·L ⁻¹	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	诱导率/%	愈伤生长情况
0.1	0.1	0 ^h	几乎无愈伤组织产生
0.1	0.5	19.5±2.6 ^{cde}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
0.1	1.0	17.9±6.3 ^{de}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
0.1	1.5	25.3±7.0 ^{bcd}	愈伤组织深绿色颗粒状, 生长良好
0.5	0.1	9.0±2.6 ^{fe}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长缓慢
0.5	0.5	30.3±9.2 ^b	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
0.5	1.0	39.8±2.6 ^a	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
0.5	1.5	12.8±3.8 ^{efg}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长缓慢
1.0	0.1	10.1±3.3 ^{fe}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长缓慢
1.0	0.5	24.6±7.1 ^{bcd}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
1.0	1.0	26.6±3.3 ^{bc}	愈伤组织绿色颗粒状, 生长良好
1.0	1.5	20.0±7.9 ^{cde}	愈伤组织深绿色颗粒状, 生长良好
1.5	0.1	0 ^h	几乎无愈伤组织产生
1.5	0.5	20.4±8.8 ^{cde}	愈伤组织深绿色颗粒状, 生长良好
1.5	1.0	15.3±7.6 ^{ef}	愈伤组织深绿色颗粒状, 生长缓慢
1.5	1.5	7.3±4.8 ^{gh}	愈伤组织褐化

同一列数字后的不同字母表示0.05水平差异显著, 结果数据为平均值±标准差。下表同此。

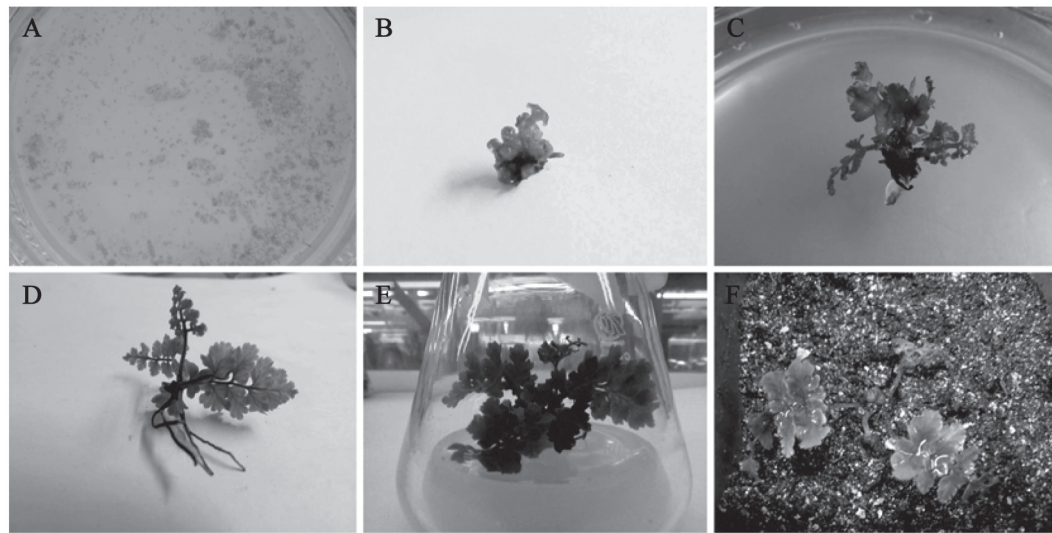


图1 阔鳞鳞毛蕨孢子无菌繁殖
Fig.1 The tissue culture of *D. championii*

A: 孢子萌发; B: 愈伤组织; C: 丛生芽; D: 幼孢子体苗生根; E: 孢子体苗; F: 移栽苗。

导率呈下降趋势。NAA对诱导丛生芽无促进作用, 随着添加浓度的升高, 诱导率逐渐降低。在愈伤组织分化成芽的过程中, 及时对丛生芽进行分割, 可以促进其快速增殖从而得到大量无菌孢子体(图1-C)。

4 幼孢子体苗生根的诱导

幼孢子体苗在不同的生根培养基中均能生根

(图1-D), 生根率达100%。不同无机盐浓度对幼孢子体苗生根无显著影响, 生根条数均在3~4根(表4)。NAA和IAA对生根有促进作用, 添加此两种生长调节剂的培养基中幼苗生根数较无生长调节剂培养基多1~2根。NAA与IAA对生根的促进作用无显著差别差异。当NAA与IAA共同使用时, 生根效果最佳。

表3 不同浓度KT和NAA对丛生芽诱导的影响

Table 3 Effects of different concentrations of KT and NAA on buds induction

KT浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	丛生芽诱导率/%
0	0	65.7±6.2 ^a
0	0.2	35.0±16.5 ^{bc}
0	0.5	44.7±7.7 ^b
0	1	24.0±6.3 ^c
0.2	0	66.3±11.9 ^a
0.5	0	44.7±14.1 ^b

表4 不同生根培养基对诱导生根的影响

Table 4 Effects of different medium on roots induction

无机盐	NAA浓度/mg·L ⁻¹	IAA浓度/mg·L ⁻¹	生根数
1/2MS	0	0	3.4±0.9 ^c
MS	0	0	3.6±0.5 ^{bc}
MS	0	0.2	4.8±0.8 ^{ab}
MS	0.2	0	4.6±1.1 ^{abc}
MS	0.2	0.2	5.2±0.8 ^a

5 炼苗移栽

移栽前清理根部培养基并对基质高温灭菌(图1-E)可有效减少污染,避免对幼苗造成伤害(图1-F)。适度喷水保持移栽环境的湿度,30 d后成活率可达80%。

讨 论

1 无机盐浓度和蔗糖浓度对孢子萌发的影响

Miller (1968)认为,营养液成分通常只影响配子体的发育,而对孢子萌发的影响不大。但在本实验中发现阔鳞鳞毛蕨孢子对培养基中无机盐浓度以及蔗糖浓度的反应不同。阔鳞鳞毛蕨孢子在3种不同无机盐浓度培养基中(MS、1/2MS、1/4MS)均能萌发,但在1/2MS中萌发率最高,并且后期配子体发育阶段生长情况最佳,配子体颜色嫩绿,发育正常。而在MS和1/4MS中,后期配子体呈黄绿色,发育迟缓。球子蕨(*Onoclea sensibilis*)孢子在1/2MS培养基中的萌发率比在1/4MS培养基中高5%,而比在MS培养基中高约20% (张婷婷等2012)。对马耳蕨(*Polystichum tsus-simense*)孢子在1/2MS培养基中萌发率高于MS和1/4MS培养基,达到90%以上(敖金成等2010)。张银丽等(2009)对槲蕨(*Drynaria roosii*)孢子进行萌发实验,发现1/2MS

培养基是槲蕨孢子萌发和配子体发育的最佳培养基。也有一些种类的蕨类植物萌发需要高浓度的无机盐,如粗梗水蕨(*Ceratopteris pteridoides*)在MS全量培养基中萌发率最高,可到60.5%,比在1/2MS或1/5MS培养基中高约16% (孙锐等2008)。银粉背蕨(*Aleuritopteris argentea*)也以MS为孢子萌发和原叶体生长最适培养基(黄笛等2009)。

蕨类植物组织培养中最常用的碳源是蔗糖。最适宜蔗糖浓度的确定是由两方面因素决定的,一是蔗糖作为营养物质的作用,二是蔗糖作为渗透调节剂的作用。一般而言,随着浓度的增加,蔗糖对孢子萌发的抑制作用加重,却促进配子体干重增加。郭捡等(2013)研究鹿角蕨(*Platyserium wallichii*)时发现,当蔗糖含量小于2%时,萌发率在90%以上,当蔗糖含量进一步升高时,萌发率明显下降。低浓度的蔗糖有利于肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)孢子的萌发,高浓度的蔗糖有利于其孢子体的形成(刘保东和檀龙颜2009)。本实验研究发现,低浓度的蔗糖有利于阔鳞鳞毛蕨孢子的萌发,蔗糖浓度2%为最适含量。这与徐艳等(2005)、欧阳娟娟等(2008)在研究蔗糖含量对孢子萌发的影响中得出的结论是一致的。也有一些蕨类植物的孢子在高浓度蔗糖含量下的萌发率高于在低浓度蔗糖含量下。这可能与不同种类孢子的大小、孢子壁厚度、孢子内储藏物质含量的差异以及萌发时对培养基碳源和其他营养物质及渗透压的要求不同有关(张正修和戴绍军2010)。

在本实验设置的三个因素中,赤霉素浓度对孢子萌发的影响最大。用100 mg·L⁻¹的赤霉素溶液浸泡孢子,孢子的萌发率有较显著提高。这可能与赤霉素可以打破孢子休眠,加快其萌发进程有关。本研究发现,阔鳞鳞毛蕨孢子萌发的最适培养基为1/2MS+2%蔗糖,用赤霉素对孢子进行预处理能提高孢子的萌发率。经过正交实验得出的结果进行验证实验,孢子的萌发率能达到65%以上。

2 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

研究表明,蕨类植物的愈伤组织、GGB和芽的诱导一般需要细胞分裂素和生长素的协同作用。李静等(2008)对狭眼凤尾蕨(*Pteris biaurita*)的原叶体进行愈伤诱导,发现0.5~2.0 mg·L⁻¹的2,4-D对诱导原叶体脱分化为愈伤组织均有作用,但以1

mg·L⁻¹为最佳。用0.5~2.0 mg·L⁻¹的2,4-D和0.5~1.0 mg·L⁻¹的KT可以诱导禾秆蹄盖蕨原叶体形成愈伤组织(Yoshihara等2005)。本实验用KT和2,4-D组合也成功诱导出了愈伤组织,愈伤组织呈绿色颗粒状,质地疏松。在后期试验中发现,这种愈伤组织可以分化出孢子体苗。综合分析认为,细胞分裂素类物质对蕨类植物愈伤组织的诱导起关键作用,适当比例的细胞分裂素与生长素的组合可以诱导出不同形态的愈伤组织。

3 植物生长调节剂对丛生芽分化的影响

KT有利于芽的分化,并且在芽的增殖过程中起重要作用。Loescher (1979)用波士顿蕨(*Nephrolepis exaltata* 'Bostoniensis')的茎尖作为外植体,在不添加外源生长调节剂的情况下也能诱导出不定芽,但加入KT和NAA可以起到促进作用。Fernandez和Revilla (2003)认为,愈伤组织在无生长调节剂或添加低浓度生长素的培养基中即可分化出芽。本研究发现,在不添加生长调节剂的培养基中,愈伤组织分化出芽。在添加NAA的培养基中,随着NAA含量的升高,丛生芽诱导率呈下降趋势。0.2 mg·L⁻¹的KT对丛生芽的诱导效果最好。

4 植物生长调节剂对生根的影响

秦廷豪和邹宗兰(2004)对鸟巢蕨进行的生根实验中发现单独使用NAA与将NAA和IBA配合使用相比生根效果较差,后者形成的根条数与根长度都比单独使用NAA更好。菜蕨(*Callipteris esculenta*)的孢子体在1/2MS培养基中的生根时间比在MS培养基中早12 d,说明较低浓度的无机盐有利于生根(郭治友等2010)。本研究发现,在不添加生长调节剂的培养基中,孢子体也能生根,生根条数在3~4条,根长度较短。不同无机盐含量的培养基之间根条数无显著差异。添加生长调节剂的培养基中,生根条数为5~6条,长度比不添加生长调节剂的培养基要长。两种生长调节剂对幼苗生根的促进作用差异不明显。当二者共同使用时,更能有效促进幼苗生根。

本实验通过对阔鳞鳞毛蕨孢子的无菌培养,研究了不同因素对孢子萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分化及生根的影响,建立了快速繁殖体系,为阔鳞鳞毛蕨的规模化生产提供了基础。

参考文献

- 敖金成, 苏文华, 张光飞, 姜维(2010). 对马耳蕨的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (5): 483-484
- 郭俭, 刘婷婷, 孟宪利, 刘保东(2013). 鹿角蕨的孢子培养及其繁殖. 园艺学报, 40 (1): 155-162
- 郭治友, 俞筱押, 罗应, 钱绍方(2010). 菜蕨的组织培养与植株再生. 植物生理学通讯, 46 (1): 59-60
- 黄笛, 冯玉兰, 董丽(2009). 银粉背蕨的配子体发育及孢子繁殖技术的研究. 园艺学报, 36 (9): 1345-1352
- 李静, 夏桂春, 龚慧, 曾宪锋(2008). 狭眼凤尾蕨的形态发生及组织培养. 热带作物学报, 29 (5): 626-631
- 刘保东, 檀龙颜(2009). 肾蕨和镰叶肾蕨配子体发育及孢子繁殖研究. 园艺学报, 36 (4): 545-552
- 欧阳婵娟, 唐源江, 王瑞江(2008). 变异鳞毛蕨的孢子培养与配子体发育研究. 热带亚热带植物学报, 16 (4): 344-349
- 秦廷豪, 邹宗兰(2004). 鸟巢蕨的组织培养. 植物生理学通讯, 40 (3): 349
- 孙锐, 邓子厚, 刘胜祥, 李学宝, 崔鸿, 李娟(2008). 粗梗水蕨孢子无菌繁殖的研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 42 (4): 620-623
- 徐艳, 石雷, 刘燕, 李东(2005). 白玉凤尾蕨孢子繁殖技术的研究. 园艺学报, 32 (4): 658-662
- 杨军, 黄斌, 陈玉林, 刘兴剑, 孙起梦(2011). 6种南京乡土蕨类植物的盆栽引种试验. 江苏农业科学, 39 (4): 182-183
- 张婷婷, 王晓倩, 高凤, 董丽(2012). 球子蕨孢子的无菌繁殖. 植物生理学报, 48 (11): 1079-1083
- 张银丽, 杜红红, 李杨, 李东, 季梦成, 姜闯道, 石雷(2009). 消毒方式、无机盐浓度及光照强度对榭蕨孢子繁殖的影响. 园艺学报, 36 (5): 711-716
- 张正修, 戴绍军(2010). 环境因子对蕨类植物孢子萌发的影响. 生态学报, 30 (7): 1882-1893
- Fernandez H, Revilla MA (2003). *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss Org Cult, 73 (1): 1-13
- Loescher WH (1979). Development in vitro of *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis* runner tissues. Physiol Plant, 47: 25-254
- Miller JH (1968). Fern gametophytes as experimental material. Bot Rev, 34 (4): 361-440
- Yoshihara T, Tsunokawa K, Miyano Y, Arashima Y, Hodoshima H, Shoji K, Shimada H, Goto F (2005). Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its cadmium tolerance and accumulation capacity. Plant Cell Rep, 23 (8): 579-585